

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

**0 233 600  
A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 87101991.5

(51) Int. Cl. 4: **C07K 7/40, A61K 37/26**

(22) Anmeldetag: 12.02.87

(30) Priorität: 15.02.86 DE 360486B

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
26.08.87 Patentblatt 87/35

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-3550 Marburg 1(DE)**

(72) Erfinder: **Löbermann, Hartmut Dr.  
Giessener Strasse 50  
D-3556 Weimar(DE)  
Erfinder: Pâques, Eric Paul Dr.  
Schmiedeacker 18  
D-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Helmburger, Norbert Prof. Dr.  
Sonnenhang 10  
D-3550 Marburg(DE)**

(74) Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.  
et al  
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale  
Patentabteilung Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)**

(54) **Insulinderivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.**

(57) Es werden Insulinderivate der allgemeinen Formeln I und II  
 $X-(Y_1-S-S-Y_2-Z-"Insulin")_m$  I

$A-S-Y_3-Z-"Insulin"$  II

worin

X eine physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung ist,

$Y_1$ ,  $Y_2$  und  $Y_3$  unabhängig voneinander eine chemische Bindung, oder eine organisch chemische Verbrückung sind,

S ein Schwefelatom ist,

"Insulin" den biologisch aktiven peptidartigen Anteil eines natürlichen oder semisynthetischen, synthetischen oder gentechnisch hergestellten Insulins oder eines seiner biologisch aktiven Analoga ohne die nicht essentielle Aminofunktion bedeutet,

Z eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion ist,

A ein Wasserstoffatom oder eine thiolhaltige, physiologisch verträgliche Kohlenwasserstoffverbindung ist und  
m eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist,

diese Derivate enthaltende Mittel, Verfahren zur Herstellung dieser Derivate sowie ihre Verwendung zur Behandlung von Stoffwechselstörungen beschrieben.

Xerox Copy Centre

### Insulinderivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft Insulinderivate, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Anwendung.

Insulin ist ein Polypeptidhormon mit einem Molekulargewicht von etwa 6.000 Dalton. Seine beiden Aminosäureketten A und B sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Insulin wird als Proinsulinform in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas synthetisiert und durch proteolytische Modifizierung unter Abspaltung eines als C-Peptid bezeichneten Teils als aktive Form ausgeschieden. Es besitzt eine wichtige Funktion im Glucosestoffwechsel von Säugern. Neben seiner blutzuckersenkenden Eigenschaft hat es auch Einfluß auf den Protein- und Fettsäurestoffwechsel.

Es ist bekannt, daß Insulin zur Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt werden kann. Durch Zusatz von Protamin oder Spermidin oder ähnlichen Verbindungen oder durch Zusatz von Zinksalzen erhält man schwerlösliche Insulinderivate, die zum Beispiel bei subkutaner Applikation eine langanhaltende Blutzuckersenkung bewirken. Bei diesen langwirkenden Depot-Insulinderivaten können jedoch Nebenwirkungen auftreten. Außerdem werden diese schwerlöslichen Insulinverbindungen bei s.c. Applikation häufig ungleich resorbiert.

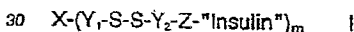
Im Gegensatz dazu ist "Altinsulin" rasch wirksam. Die Wirkung klingt aber nach wenigen Stunden ab. Aufgabe der Erfindung ist daher die Entwicklung eines intramuskulär oder subkutan resorbierbaren Insulinderivates, das neben einer guten Löslichkeit die Nachteile des Altinsulins oder der langwirkenden Depot-Insuline nicht oder nur vermindert aufweist.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß durch eine Bindung von Insulin an eine physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung ein wasserlösliches Insulinderivat hergestellt werden kann, das eine vergleichbar rasche Wirkung wie "Altinsulin" entfaltet, jedoch im Vergleich dazu eine deutlich längere Wirkdauer ähnlich wie ein Depotinsulin besitzt.

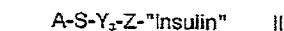
Es wurde weiterhin überraschenderweise gefunden, daß durch Kupplung von Insulin an einen Proteinase-Inhibitor ein Insulinderivat hergestellt werden kann, das gegen proteolytische Inaktivierung geschützt ist.

Es wurde weiter überraschenderweise gefunden, daß durch eine Bindung von Insulin an eine physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung über eine Disulfidbrücke ein Insulinderivat erhalten werden kann, das eine definierte Stöchiometrie von Insulin zu Kohlenstoffverbindung besitzt.

Gegenstand der Erfindung ist ein Insulinderivat der allgemeinen Formel I



oder II



worin

X eine physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung ist,

$Y_1$ ,  $Y_2$  und  $Y_3$  unabhängig voneinander eine chemische Bindung, oder eine organisch chemische Verbrückung sind,

40 S ein Schwefelatom ist,

"Insulin" den biologisch aktiven peptidartigen Anteil eines natürlichen oder semisynthetischen, synthetischen oder gentechnisch hergestellten Insulins oder eines seiner biologisch aktiven Analoga ohne die nicht essentielle Aminofunktion bedeutet,

Z eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion ist,

45 A ein Wasserstoffatom oder eine thiolhaltige, physiologisch verträgliche Kohlenwasserstoffverbindung ist und

m eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist.

Als physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung können Dextran, Hydroxyethylstärke, Gelatine oder verwandte abgebaute bzw. quervernetzte Kollagenverbindungen, Polyaminosäureverbindungen, Polyoxyethylen oder Polyvinylpyrrolidon und deren Derivate, aber vorzugsweise ein lösliches Polymer, insbesondere ein Polypeptid oder Protein verwendet werden. Die Molekulargewichte liegen zwischen 500 und  $1,5 \times 10^6$  Dalton, vorzugsweise aber zwischen 2.000 und 500.000 Dalton.

In einem besonders bevorzugten Insulinderivat wird als physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung ein Enzym-Inhibitor, besonders ein Proteinase-Inhibitor, beispielsweise  $\alpha_1$ -Antitrypsin, verwendet.

$Y_1$ ,  $Y_2$  und  $Y_3$  können unabhängig voneinander eine chemische Bindung oder eine organisch chemische Verbückung, vorzugsweise ein aliphatischer, araliphatischer oder aromatischer Kohlenwasserstoffrest sein, in dem Kohlenstoffatome oder Wasserstoffatome durch Heteroatome, besonders N, O, P oder S ersetzt sein können.

5 In einem bevorzugten Insulinderivat bedeuten  $Y_1$  oder  $Y_3$  eine Bindung und enthält  $Y_2$  eine  $-CH_2-CH_2-CO$ -Gruppe.

Z bedeutet eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion, vorzugsweise aber die N-terminale Aminosäure der B-Kette des Insulins.

In einem besonders bevorzugten Insulinderivat wird ein Insulin verwendet, das die folgende N-terminale Sequenz in der B-Kette hat: Phe(1)-Val(2)-Asn(3)-Glu(4)-His(5)-Leu(6).

10 Z-"Insulin" bedeutet ein natürliches oder ein semisynthetisch, synthetisch oder gentechnisch hergestelltes Insulin oder eines seiner biologisch aktiven Analoga. Es können auch "Insuline" verwendet werden, die in der B-Kette N-terminal oder C-terminal verkürzt oder verlängert worden sind.

Vorzugsweise wird aber ein Insulin verwendet, das als N-terminale Aminosäure in der A-Kette Glycin und in der B-Kette Phenylalanin besitzt.

Besonders bevorzugt werden Human-, Schweine- oder Rinderinsulin verwendet.

"Insulin" bedeutet den biologisch aktiven peptidartigen Anteil von Insulin ohne die nicht essentielle Aminofunktion Z.

Falls A eine thiolhaltige, physiologisch verträgliche Kohlenwasserstoffverbindung bedeutet, kann als 20 solche ein Aliphath, Araliphath oder Aromat verwendet werden, in denen Kohlenstoffatome oder Wasserstoffatome durch Heteroatome, besonders N, O, P oder S ersetzt sein können. Diese Kohlenstoffverbindung enthält von 1 bis 50, vorzugsweise 1 bis 20 Kohlenstoffatome und von 0 bis 30, vorzugsweise 0 bis 15 Heteroatome. In einem bevorzugten Insulinderivat werden Thiopyridin, Cystein, Thiopropionsäure, Thiopyridylcarbonsäure, Mercaptobernsteinsäure, Gluthathion, Cysteamin oder Thiamin verwendet. In einem besonders 25 bevorzugten Insulinderivat wird ein substituierter Pyridylrest, beispielsweise 2-Mercaptopyridin verwendet. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Insulinderivates der Formel I oder II, dadurch gekennzeichnet, daß eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion in ein Thiol oder eine die Thiolfunktion in geschützter Form enthaltende Verbindung der Formel III

30 Schutzgruppe-S- $Y_3$ -Z-Insulin III

umgewandelt und gegebenenfalls mit einem Thiol umgesetzt wird, wonach eine Verbindung der Formel I oder II erhalten wird.

35 Besonders ist Gegenstand der Erfindung ein solches Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß selektiv die N-terminale Aminosäure der A-Kette eines Insulins und das Lysin B-29 der B-Kette eines Insulins mit einer Aminoschutzfunktion versehen und die N-terminale Aminosäure der B-Kette des Insulins mit einer thiolhaltigen oder die Thiolfunktion in einer geschützten Form enthaltenden Verbindung, die mit Aminogruppen reagieren kann, umgesetzt werden, wodurch die Thiolfunktion kovalent an die N-terminale Aminosäure 40 der Insulin-B-Kette gebunden wird, und die Aminoschutzgruppen und gegebenenfalls die Thiolschutzgruppe entfernt werden und gegebenenfalls mit einer Verbindung der Formel X-Y-SH reagieren gelassen wird.

In einer bevorzugten Verfahrensweise werden zunächst die Aminofunktionen von Glycin-A-1 sowie Lysin-B-29 nach in der Peptidchemie üblichen Methoden selektiv geschützt wie beispielsweise durch Umsetzung mit t-Butyloxycarbonyl-Aktivesterderivaten unter Einführung der t-Butyloxycarbonylgruppe (Boc), wobei ein 45 als Bis-Boc-Insulin bezeichnetes Derivat entsteht. In einem besonders bevorzugten Verfahren wird t-Butyloxycarbonyl-Hydroxisuccinimidester (Boc-Osu; Chem.Ber. (1975) 108, 2758-2763) verwendet. Dann wird eine Thiolfunktion gegebenenfalls in Form einer Verbindung, die diese in einer geschützten Form enthält, eingeführt. Unter einer geschützten Form der Thiolgruppe versteht man eine Verbindung, in der die Thiolfunktion über eine Disulfidbindung mit einer anderen thiolhaltigen Komponente, wie beispielsweise 50 Pyridinthion, verbunden ist. Die thiolhaltige Komponente kann dann unter reduzierenden Bedingungen abgespalten werden.

In einer bevorzugten Verfahrensweise wird das Bis-Boc-Insulinderivat mit einem Thiol oder eine ein Thiol in geschützter Form enthaltenden Reaktivkomponente, beispielsweise ein Thioalkylimidat, Thiolacton oder Pyridyldithioester umgesetzt. Durch Reaktion der N-terminalen Aminogruppe der intakten oder verkürzten 55 Insulin-B-Kette mit einem thiolhaltigen Aktivester, wobei beispielsweise Ester des Hydroxisuccinimids oder o- oder p-Nitrophenols verwendet werden können, wird die Thiolfunktion eingeführt.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensweise wird als thiolhaltige Reaktivkomponente N-Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio)-propionat verwendet.

Anschließend werden nach in der Peptidchemie üblichen Methoden die t-Butyloxycarbonyl(Boc)-Schutzgruppen abgespalten, beispielsweise durch Behandlung mit Trifluoressigsäure oder einem HCl/Essigsäure-Gemisch; aber bevorzugt Trifluoressigsäure.

Das auf die oben beschriebene Weise hergestellte thiolhaltige Insulinderivat wird zur Herstellung eines Insulinderivates der allgemeinen Formel I nun mit einer thiolhaltigen oder die Thiofunktion in geschützter Form enthaltenden physiologisch verträglichen Kohlenstoffverbindung zusammengebracht. Über Disulfidaustausch zwischen Insulin und Kohlenstoffverbindung, die beide die Thiofunktion oder diese in einer geschützten Form enthalten, wird ein Insulin-S-S-Kohlenstoffverbindung-Komplex hergestellt.

In einer bevorzugten Verfahrensweise wird als physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung ein thiolhaltiges Protein, zum Beispiel ein Proteinase-Inhibitor oder thiolhaltiger Träger, verwendet. In einem besonders bevorzugten Verfahren wird alpha,-Antitrypsin verwendet. Es ist jedoch auch möglich, Träger zu verwenden, die zunächst keine Thiofunktion oder diese in einer geschützten Form enthalten. Solche Trägersubstanzen werden vor der Umsetzung mit thiofunktionalisiertem Insulin mit thiolhaltigen Reaktivkomponenten, beispielsweise Thiolactonen oder N-Succinimidyl-3-2(Pyridyldithio)propionat (SPDP) umgesetzt; besonders bevorzugt wird die Umsetzung mit SPDP.

Zur Herstellung eines Insulinderivates der allgemeinen Formel II wird das auf die oben beschriebene Weise hergestellte thiolhaltige Insulinderivat mit einer thiolhaltigen oder die Thiofunktion in geschützter Form enthaltenden physiologisch verträglichen Kohlenstoffverbindung umgesetzt. Über Disulfidaustausch wird eine Insulin-S-S-Kohlenstoffverbindung hergestellt.

In einer bevorzugten Verfahrensweise wird als thiolhaltige Kohlenstoffverbindung beispielsweise Pyridinthion, Cystein, Mercaptopropionsäure, Mercaptoessigsäure, Pyridinthioncarbonsäure, Glutathion, Cysteamin, Mercaptobemsteinsäure oder Thiamin verwendet. In einer besonders bevorzugten Verfahrensweise wird Pyridinthion verwendet.

Ein auf die oben beschriebene Weise hergestellter alpha,-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex oder Pyridyl-S-S-Insulin-Komplex zeichnet sich besonders dadurch aus, daß die biologische Aktivität des Insulins erhalten bleibt, daß er auch bei physiologischem pH-Wert wasserlöslich und sowohl i.m. als auch subkutan resorbierbar ist, daß er im Falle des alpha,-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplexes gegen proteolytische Inaktivierung geschützt ist, daß eine definierte Stöchiometrie zwischen Insulin und physiologisch verträglicher Substanz vorliegt, und daß die pharmakokinetischen Eigenschaften vorteilhafter als die des Atinsulins oder der langwirkenden Depotinsuline sind.

Die pharmokokinetischen Daten eines alpha,-Antitrypsin-Insulin-Komplexes für intravenöse und subkutane Applikation sind in Tabelle 1 dargestellt.

Die auf die oben beschriebene Weise hergestellten Komplexe zwischen Insulin und alpha,-Antitrypsin oder Pyridinthion können zur Behandlung von Stoffwechselerkrankungen, beispielsweise des Diabetes mellitus, eingesetzt werden.

Diese Insulinverbindungen können in Form von Mitteln, die blutisotönisch und bakterizid gemacht worden sind und gegebenenfalls geeignete physiologisch verträgliche Zusätze und Stabilisatoren enthalten, verabreicht werden.

Die Insulinderivate können parenteral, z.B. i.v., i.m., s.c. oder mittels einer Insulinpumpe appliziert werden.

Die folgenden Beispiel erläutern die Erfindung.

#### Beispiel 1

#### Albumin-S-S-Insulin-Komplex

##### a) Bis-Boc-Insulin

1 g Schweineinsulin wurde in 37,5 ml DMF, 9,5 ml H<sub>2</sub>O und 2,7 ml 1 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gelöst. Anschließend wurden 930 mg t-Butyloxycarbonyl-Hydroxisuccinimidester, der in 2 ml DMF gelöst war, zugesetzt. Die Mischung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit 50 % Essigsäure auf pH 6,9 eingestellt und das Lösungsmittel abrotiert. Der ölige Rückstand wurde mit 10 ml Methanol versetzt und anschließend in ca. 250 ml Diethylether eingegossen. Der Niederschlag wurde über eine Glasfritte abgetrennt, mit Essigsäureethylester und Diethylether mehrfach gewaschen und über KOH P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. An-

schließlich wurde der getrocknete Niederschlag in 6 ml 0,5 %  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gelöst und über Sephadex® G-50<sub>sf</sub> in 0,5 %  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gefiltriert. Die Bis-Boc-Insulin enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und anschließend lyophilisiert. Auswaage: 0,85 g.

5

#### b) PDP-Bi-Boc-Insulin

Zu 36 mg Bi-Boc-Insulinderivat in 3 ml 0,1 mol/l Natriumphosphat, 100 mmol/l NaCl pH 7,5 fügte man unter Rühren tropfenweise 300  $\mu\text{l}$  N-Succinimidyl-3-2(Pyridyldithio)propionat(SPDP)-Lösung (20 mmol/l in  
10 Ethanol) zu. Die Lösung ließ man 30 min. bei Raumtemperatur stehen. Das 2-Pyridyl-S-S- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-NH-Gly-Insulin-bi-Boc}$  (PDP-Bi-Boc-Insulin) trennte man durch Gelfiltration an Sephadex G-50 in 5 g/l  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,5 von Verunreinigungen ab und lyophilisierte anschließend.

#### 15 c) PDP-Insulin

30mg PDP-Bi-Boc-Insulin löste man in 400  $\mu\text{l}$  Trifluoressigsäure, die 40  $\mu\text{l}$  Anisol enthält. Die Lösung ließ man unter Feuchtigkeitsausschluß 30 min. bei RT und 15 min bei 4°C stehen. Anschließend goß man die Lösung in etwa 100 ml kalten Ether. Der Niederschlag wurde mehrfach mit Ether gewaschen, in 3 ml 5  
20 g/l  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,5 gelöst und durch Gelfiltration an Sephadex® G-50 von Verunreinigungen befreit. Das reine PDP-Insulin wurde anschließend lyophilisiert. Im UV-Spektrum war nach Reduktion mit 0,5 mmol/l Dithiothreitol (DTE) eine zusätzliche Bande bei  $\lambda_{\text{max}}$  343 nm zu erkennen, die freiem Pyridinthion entspricht.

#### 25 d) Albumin-S-S-Insulin

33 mg Mercaptalbumin wurden in 4 ml 50 mmol/l Kaliumphosphat, 200 mmol/l NaCl pH 8,5 gelöst und mit 3,3 mg PDP-Insulin in 1 ml des gleichen Puffers gemischt. Die Reaktionslösung ließ man 1 h bei RT und 4 h bei 4°C stehen. Der gebildete Albumin-S-S-Insulin-Komplex wurde durch Gelfiltration an Biogel® P  
30 100 von den Reaktionspartnern abgetrennt. Im SDS-Gel war eine Bande, die einem Produkt von etwa 72.000 Dalton entsprach, zu erkennen, die sich nach Reduktion mit DTE in 2 Banden mit etwa 66.000 Dalton und 6.000 Dalton aufspaltet.

#### 35 Beispiel 2

PDP-Insulin wurde wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt.

27 mg alpha,-Antitrypsin wurden in 2 ml einer Lösung, die 50 mmol/l Kaliumphosphat und 200 mmol/l  
40 NaCl (pH 8,5) und 25 mmol/l Dithiothreitol enthält, gelöst. Die Reduktionslösung ließ man 1 h bei 37°C und 1 h bei 4°C stehen und trennte anschließend das Reduktionsmittel durch Gelfiltration an Sephadex® G-50 in gleichem Puffer ab. 27 mg alpha,-Antitrypsin-SH in 6 ml obigen Puffers mischte man mit 3,2 mg PDP-Insulin in 1 ml Puffer. Die Behandlung und Aufarbeitung der Komplexmischung wurde wie in Beispiel 1 beschrieben vorgenommen. Im SDS-Gel war eine Bande mit einem MG von etwa 60.000 Dalton zu erkennen.  
45 Sie zerfiel nach Reduktion mit DTE in 2 Banden mit Molekulargewichten von etwa 54.000 und 6.000 Dalton. Der gereinigte alpha,-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex zeigte inhibierende Eigenschaften gegenüber Proteasen wie Chymotrypsin, Trypsin und Elastase.

#### 50 Beispiel 3

Es wurde ein alpha,-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex wie in Beispiel 2 hergestellt, wobei Schweineinsulin durch Humaninsulin ersetzt wurde.

55

Tabelle 1

Blutzuckerwert im Kaninchen nach Applikation von Altinsulin oder alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin-Insulin-Komplex in % Abhängigkeit von der Zeit in Prozent des Anfangswertes

t in h	Intravenös IE/ml/kg				Subkutan IE/ml/kg			
	0,5		1,0		0,5		1,0	
	AI	KI	AI	KI	AI	KI	AI	KI
0	100		100		100		100	
0,5	20	34	18	32	45	85	45	85
1	25	40	20	35	42	58	43	58
2	45	35	42	30	45	52	45	47
3	80	45	70	40	37	45	43	35
4	110	65	92	53	52	45	53	32
5	125	90	108	74	65	50	78	35
6	-	-	-	-	105	55	80	40

AI = Altinsulin

KI = Alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex

IE = Internationale Insulineinheit

Jeder Blutzuckerwert stellt den Mittelwert aus der Bestimmung in 4 Kaninchen dar. Es wurde angenommen, daß eine Substanz, die 1 mg Insulin enthält, die blutzuckersenkende Wirkung von 25 IE Insulin besitzt.

#### Beispiel 4

Es wurde ein alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex wie in Beispiel 2 hergestellt, wobei anstelle von Schweineinsulin Rinderinsulin verwendet wurde.

#### Beispiel 5

Pankreatischer Trypsininhibitor (PTI)-S-S-Insulin-Komplex

Zunächst wurde PTI nach J.Biol.Chem. 235 (2), 396-404 (1960) mit N-Acetyl-DL-Homocysteine-Thiolacton umgesetzt. Man erhielt einen Thiol-funktionalisierten Inhibitor. Die Umsetzung mit PDP-Insulin zum Komplex wurde wie in Beispiel 1 beschrieben ausgeführt. Der PTI-S-S-Insulin-Komplex zeigte inhibitorische Eigenschaften gegenüber Plasmin und Trypsin. Im SDS-Gel war eine Bande mit einem MG von 12.000 Dalton zu erkennen.

#### Beispiel 6

## Dextran-S-S-Insulin-Komplex

Aminofunktionalisiertes Dextran wurde wie in Beispiel 3 beschrieben mit N-Acetyl-DL-Homocysteinethio-  
lacton umgesetzt. Der Thiolgehalt pro mol Dextran betrug etwa 4 mol Thiolgruppen. Die weitere Umsetzung  
5 mit PDP-Insulin zum Komplex wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

## Beispiel 7

## 10 Cystein-S-S-Insulin-Komplex

PDP-Insulin (25, mg), wie in Beispiel 1 beschrieben, hergestellt und gelöst in 5 ml 50 mmol/l  
Natriumphosphat und 150 mmol/l NaCl, pH 5,0 wurde mit 0,75 g Cysteinhydrochlorid in 100 µl desselben  
Puffers umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Messung des freigesetzten Pyridinthions bei 343 nm verfolgt.  
15 Das Reaktionsprodukt wurde durch Gelfiltration an Sephadex® G-50<sub>sf</sub> in 5 g/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,3 von  
Verunreinigungen abgetrennt und lyophilisiert.

## Beispiel 8

## 20 Thiamin-S-S-Insulin-Komplex

25 mg PDP-Insulin in 2 ml 50 mmol/l Natriumphosphat, pH 8,0 wurden mit 0,7 mg Dithiothreitol  
behandelt. Anschließend wurde mit 3 mg Thiamintetrahydrofurfuryldisulfid in 2 ml obigen Puffers umgesetzt.  
25 Das Reaktionsprodukt wurde durch Gelfiltration an Sephadex® G-50<sub>sf</sub> in 5 g/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,3 von  
Verunreinigungen abgetrennt und lyophilisiert.

Die Insulinverbindungen nach Beispiel 5 bis 8 zeigten im Kaninchenmodell eine blutzuckersenkende  
Wirkung.

30

## Ansprüche

1. Insulinderivat der allgemeinen Formel I

35  $X-(Y_1-S-S-Y_2-Z-"Insulin")_m$  I

oder II

A-S-Y<sub>3</sub>-Z-"Insulin" II

40

worin

X eine physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung ist,

Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> und Y<sub>3</sub> unabhängig voneinander eine chemische Bindung oder eine organisch chemische Ver-  
45 brückung sind,

S ein Schwefelatom ist,

"Insulin" den biologisch aktiven peptidartigen Anteil eines natürlichen oder semisynthetischen, syntheti-  
schen oder gentechnisch hergestellten Insulins oder eines seiner biologisch aktiven Analoga ohne die nicht  
essentielle Aminofunktion bedeutet,

50 Z eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion ist,

A ein Wasserstoffatom oder eine thiolhaltige, physiologisch verträgliche Kohlenwasserstoffverbindung ist  
und

m eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist.

2. Insulinderivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> und Y<sub>3</sub> unabhängig voneinander  
55 eine chemische Bindung oder ein aliphatischer, araliphatischer oder aromatischer Kohlenwasserstoffrest  
sind, in dem Kohlenstoffatome oder Wasserstoffatome durch Heteroatome, besonders N, O, P oder S  
ersetzt sein können.

3. Insulinderivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß X ein lösliches, physiologisch verträgliches Polymer oder Polypeptid ist.

4. Insulinderivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß X ein Proteinaseinhibitor, vorzugsweise alpha 1-Antitrypsin ist.

5. Insulinderivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß A ein Wasserstoffatom oder eine aliphatische, araliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffverbindung ist, in der Kohlenstoffatome oder Wasserstoffatome durch Heteroatome, besonders N, O, P oder S ersetzt sein können.

6. Insulinderivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß A zwischen 1 und 50 Kohlenstoffatome, vorzugsweise aber von 1 bis 20 Kohlenstoffatome und von 0 bis 30 vorzugsweise 0 bis 15 Heteroatome enthält.

7. Insulinderivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß A der Rest von Pyridinthion oder eines substituierten Pyridinthions, eines gegebenenfalls amino-, hydroxi- oder carboxy-substituierten Mercaptoalkans, Cysteins oder eines cysteinhaltigen Peptids oder Thiamins ist.

8. Verfahren zur Herstellung eines Insulinderivats nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion in ein Thiol oder eine die Thiolfunktion in geschützter Form enthaltende Verbindung der Formel III

Schutzgruppe-S-Y<sub>2</sub>-Z-Insulin III

umgewandelt und gegebenenfalls mit einem Thiol umgesetzt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß selektiv die N-terminale Aminosäure der A-Kette eines Insulins und das Lysin B-29 der B-Kette desselben Insulins mit einer Aminoschutzfunktion versehen und die N-terminale Aminosäure der B-Kette des Insulins mit einer thiolhaltigen oder die Thiolfunktion in einer geschützten Form enthaltenden Verbindung, die mit Aminogruppen reagieren kann, umgesetzt werden, wodurch die Thiolfunktion kovalent an die N-terminale Aminosäure der Insulin-B-Kette gebunden wird, und die Aminoschutzgruppen und gegebenenfalls die Thiolschutzgruppen entfernt werden und gegebenenfalls mit einer Verbindung der Formel X-Y<sub>2</sub>-SH reagieren gelassen wird.

10. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 zur Behandlung von Stoffwechselstörungen, insbesondere zur Behandlung von Diabetes mellitus.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: ES

1. Verfahren zur Herstellung eines Insulinderivats der allgemeinen Formel I

X-(Y<sub>1</sub>-S-S-Y<sub>2</sub>-Z-"Insulin")<sub>m</sub> I

oder II

A-S-Y<sub>2</sub>-Z-"Insulin" II

worin

X eine physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung ist,

Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> und Y<sub>3</sub> unabhängig voneinander eine chemische Bindung oder eine organisch chemische Ver-

brückung sind,

S ein Schwefelatom ist,

"Insulin" den biologisch aktiven peptidartigen Anteil eines natürlichen oder semisynthetischen, synthetischen oder gentechnisch hergestellten Insulins oder eines seiner biologisch aktiven Analoga ohne die nicht essentielle Aminofunktion bedeutet,

Z eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion ist,

A ein Wasserstoffatom oder eine thiolhaltige, physiologisch verträgliche Kohlenwasserstoffverbindung ist und

m eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist,

dadurch gekennzeichnet, daß eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion in ein Thiol oder eine die Thiolfunktion in geschützter Form enthaltende Verbindung der Formel III



Schutzgruppe-S-Y<sub>1</sub>-Z-Insulin III

umgewandelt und gegebenenfalls mit einem Thiol umgesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß selektiv die N-terminale Aminosäure der A-Kette eines Insulins und das Lysin B-29 der B-Kette desselben Insulins mit einer Aminoschutzfunktion versehen und die N-terminale Aminosäure der B-Kette des Insulins mit einer thiolhaltigen oder die Thiolfunktion in einer geschützten Form enthaltenden Verbindung, die mit Aminogruppen reagieren kann, umgesetzt werden, wodurch die Thiolfunktion kovalent an die N-terminale Aminosäure der Insulin-B-Kette gebunden wird, und die Aminoschutzgruppen und gegebenenfalls die Thiolschutzgruppen entfernt werden und gegebenenfalls mit einer Verbindung der Formel X-Y<sub>1</sub>-SH reagieren gelassen wird.

15

20

25

30

35

40

45

50

55



(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 233 600  
A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 87101991.5

(51) Int. Cl. 5: C07K 7/40, A61K 37/26

(22) Anmeldetag: 12.02.87

(30) Priorität: 15.02.86 DE 3604868

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
26.08.87 Patentblatt 87/35

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 20.06.90 Patentblatt 90/25

(71) Anmelder: BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-3550 Marburg 1(DE)

(72) Erfinder: Löbermann, Hartmut Dr.  
Giessener Strasse 50  
D-3556 Weimar(DE)  
Erfinder: Pâques, Eric Paul Dr.  
Schmiedeacker 18  
D-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Heimbürger, Norbert Prof. Dr.  
Sonnenhang 10  
D-3550 Marburg(DE)

(74) Vertreter: Klein, Otto, Dr. et al  
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(54) Insulinderivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

(57) Es werden Insulinderivate der allgemeinen Formeln I und II  
$$X-(Y_1-S-S-Y_2-Z-"Insulin")_m \quad I$$

$$A-S-Y_3-Z-"Insulin" \quad II$$

worin

A ein Wasserstoffatom oder eine thiolhaltige, physiologisch verträgliche Kohlenwasserstoffverbindung ist und  
m eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist,

diese Derivate enthaltende Mittel, Verfahren zur Herstellung dieser Derivate sowie ihre Verwendung zur Behandlung von Stoffwechselstörungen beschrieben.

**EP 0 233 600 A3** X eine physiologisch verträgliche Kohlenstoffverbindung ist,  
Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> und Y<sub>3</sub> unabhängig voneinander eine chemische Bindung, oder eine organisch chemische Verbrückung sind,  
S ein Schwefelatom ist,  
"Insulin" den biologisch aktiven peptidartigen Anteil eines natürlichen oder semisynthetischen, synthetischen oder gentechnisch hergestellten Insulins oder eines seiner biologisch aktiven Analoga ohne die nicht essentielle Aminofunktion bedeutet,  
Z eine für die biologische Aktivität des Insulins nicht essentielle Aminofunktion ist,



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 87 10 1991

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
A	EP-A-0 063 109 (PHARMACIA) * Seite 2, Zeile 14 - Seite 3, Zeile 14; Seite 11, Beispiel 1; Ansprüche *	1-10	C 07 K 7/40 A 61 K 37/26
A	"SPDP-HETEROBIFUNCTIONAL REGENT" 1978, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, SE * Insgesamt *	8,9	
A	J. PHARM. PHARMACOL., vol. 31, 1979, pages 194-195, London, GB F. ETEMAD-MOGHADAM et al.: "Disul- phide cross-linked macromolecules formed by thiolated insulin and globin" * Insgesamt *	1-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
			C 07 K A 61 K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort Den Haag		Abschlußdatum der Recherche 16-03-1990	Prüfer KORSNER
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, überein- stimmendes Dokument			

EPA Form 1503 03 82



### GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Alle Anspruchsgebühren wurden innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden,
- nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

### MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Siehe Annexe -B-

- ☐ Alle weiteren Recherchegebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☒ Nur ein Teil der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchegebühren entrichtet worden sind,
- nämlich Patentansprüche: 4,9; 1-3,5-8,10 teilweise (Punkte 1 und 2)
- ☐ Keine der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen,
- nämlich Patentansprüche:



#### MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung: sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Ansprüche: 4 insgesamt; 1-3,5-10 teilweise:  
Insulinderivate der Formel I, worin X ein Proteaseinhibitor ist; Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung.
2. Ansprüche: 9 insgesamt; 1-3,5-8,10 teilweise:  
Insulinderivate der Formeln I oder II, worin die N-terminale Aminofunktion der B-Kette selektiv durch einen eine Disulfidbrücke enthaltenden Rest modifiziert ist (A und X  $\neq$  Proteinaseinhibitor);  
Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung.
3. Ansprüche: 1-3,5-8,10 teilweise:  
Andere Derivate von Insulin gemäss Anspruch 1.

NB.: Einschlägige Verbindungen sind bereits bekannt, deshalb kann kein einheitliches erfinderisches Konzept anerkannt werden. Da der Anspruch 1 ausserordentlich breit formuliert ist, und darüber hinaus die Verbindungen von Anspruch 1 chemisch nicht ausreichend beschrieben sind, ist es der DGI nicht möglich, etwa vorhandene, über die Punkte 1 und 2 hinausgehende Konzepte aufzuspüren. Sollten die Anmelder über den Umfang der Punkte 1 und 2 hinausgehenden Patentschutz anstreben, so sind sie hiermit aufgefordert, die zusätzlichen erfinderischen Konzepte klar zu spezifizieren, wobei für jedes Konzept eine separate Recherchengebühr zu entrichten ist.

Ohne Spezifikation(en) ist für Punkt 3 keine sinnvolle Recherche möglich (Siehe Art. 82-84 EPC).



Europäisches  
Patentamt  
European Patent  
Office  
Office européen  
des brevets

[Description of EP0233600](#)
[Print](#)
[Copy](#)
[Contact Us](#)
[Close](#)

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

Insulin derivatives, methods to their preparation and their use

The invention relates to of insulin derivatives, methods to their preparation as well as its application.

Insulin is a Polypeptidhormon with a molecular weight of approximately 6,000 Dalton. Its two amino acid chains A and B are linked with one another over disulfide bridges. Insulin becomes as pro insulin form in the  $\beta$ -cells pancreas synthesized and by proteolytic modification bottom cleavage one as C-peptide of referred part as active form excreted. It possesses an important function in the glucose metabolism of mammals. Beside its to blood-sugar-lower property has it also influence on the protein and fatty acid metabolisms.

It is known that insulin can become the therapy of the diabetes mellitus used. By addition of protamine or Spermidin or similar compounds or by addition of zinc salts one receives severe-soluble insulin derivatives, which cause a long lasting blood sugar lowering for the example with subcutaneous application. With these prolonged-acting depot insulin derivatives however side effects can occur. In addition these severe insulin connections become with s.c. Application frequent unequal absorbs.

In the contrast in addition "old insulin" is rapid effective. The effect fades away however after few hours.

Object of the invention is therefore the development of an intramuscular or subcutaneous resorbable Insulinderi of vates, which does not exhibit the disadvantages of the old insulin or the prolonged-acting depot insulins beside a good solubility or only reduced ones.

- ▲ top It surprisingly found that can become prepared by a connection of insulin to a physiological compatible carbon compound a water-soluble insulin derivative, a comparable rapid effect like "old insulin" the deployed, however in the comparison in addition a significant longer period of effectiveness similar as a depot insulin possesses.

It was further surprisingly found that can become prepared by clutch of insulin to an Proteinase inhibitor an insulin derivative, which is protected against proteolytic inactivation.

It was more other surprisingly found that can become obtained by a connection of insulin to a physiological compatible carbon compound over a disulfide bridge an insulin derivative, which possesses a defined stoichiometry from insulin to carbon compound.

Subject matter of the invention is an insulin derivative of the general formula I

X (Y1-S-S-Y2-Z "insulin") m I

or II

A-S-Y3-Z "insulin" II

where

X a physiological compatible carbon compound is,

Y1, Y2 and Y3 a chemical bond, or an organic chemical verb moving are independent,

S a sulphur atom is,

"Insulin" the biological active peptidartigen portion of a natural or semisynthetischen, synthetic or genetically prepared insulin or one of its biological active analogues without the not essential Aminofunktion means,

Z a Aminofunktion not essential for the biological activity of the insulin is,

A an hydrogen atom or a thiolhaltige, physiological compatible hydrocarbon compound is and m a whole number from 1 to 20 is.

As physiological compatible carbon compound can dextran, Hydroxyethylstärke, gelatin or used diminished and/or. transversecrosslinked Kollagenverbindungen, Polyaminosäureverbindungen, Polyoxyethylen or polyvinylpyrrolidone and their derivatives, but preferably a soluble polymer, in particular a polypeptide or a protein used become. The molecular weights lie between 500 and  $1,5 \times 10^6$  Dalton, preferably however between 2.000 and 500.000 Dalton.

In a particularly preferred insulin derivative an enzyme inhibitor, particularly an Proteinase inhibitor, becomes for example alpha1-Antitrypsin, used as physiological compatible carbon compound.

Y1, Y2 and Y3 can to be independently a chemical bond or an organic chemical bending, preferably more aliphatic, araliphatic or aromatic hydrocarbon residue, in that carbon atoms or hydrogen atoms by Heteroatome, particularly N, O, P or S a replaced to be able.

In a preferred insulin derivative Y1 or Y3 means a connection and contains Y2 one - CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-Gruppe.

Z means a Aminofunktion not essential for the biological activity of the insulin, preferably however the N-terminal amino acid of the B-chain of the insulin.

In a particularly preferred insulin derivative an insulin becomes used, which has the subsequent N-terminal sequence in the B-chain: Phe (1) - Val (2) - Asn (3) - Glu (4) - His (5) - Leu (6).

Z "insulin" means a natural or semisynthetisch, synthetic or genetically prepared insulin or one of its biological active analogues. "Insulins" used can also become, which in the B-chain N-terminal or C-terminal truncated or extended are.

Preferably however an insulin becomes used, which possesses glycine as N-terminal amino acid in the A-chain and in the B-chain phenylalanine.

Particularly preferred becomes human, pig or cattle insulin used.

"Insulin" means the biological active peptidartigen portion of insulin without the not essential Aminofunktion Z.

Case A a thiolhaltige, physiological compatible hydrocarbon compound meant, can become as such a Aliphatic, a Araliphatic or an aromatic used, be able in those carbon atoms or hydrogen atoms by Heteroatome, particularly N, O, P or S replaced to be. This carbon compound contains from 1 to 50, preferably 1 to 20 carbon atoms and from 0 to 30, preferably 0 to 15 Heteroatome. In a preferred insulin derivative become Thiopyridin, cysteine, Thiopropionsäure, Thiopyridylcarbonsäure, Mercaptobernsteinsäure, Gluthathion, Cysteamin or Thiamin used. In a particularly preferred insulin derivative a substituted Pyridylrest becomes, for example 2-Mercaptothiopyridin used. Subject matter of the invention is further a method to the preparation of an insulin derivative of the formula I or II, characterised in that not a Aminofunktion essential for the biological activity of the insulin in a thiol or the Thiolfunktion a compound of the formula III contained in protected form

▲ top Schutzgruppe-S-Y3-Z-Insulin III

converted and with a thiol reacted becomes if necessary, according to which a compound of the formula becomes I or II obtained.

Particularly subject matter of the invention such a method, characterised in that the selective N-terminal amino acid of the A-chain of an insulin and the lysine B-29 of the B-chain of an insulin are provided with a Aminoschutzfunktion and the N-terminal amino acid of the B-chain of the insulin with a thiolhaltigen or the Thiolfunktion in a protected form contained compound, which can react with amino group, reacted become, whereby the Thiolfunktion becomes covalent to the N-terminal amino acid of the insulin B chain bound is left, and the amino protecting groups and if necessary the Thiolschutzgruppe remote will and if necessary with a compound of the formula X-Y1-SH to react.

In a preferred procedure way first the Aminofunktionen of Glycin-A-1 as well as Lysin-B-29 becomes after in the Peptidchemie conventional methods selective protected as for example bottom introduction of the t-Butyloxycarbonylgruppe (Boc), t-esterderivaten by conversion with t-Butyloxycarbonyl-AC, whereby a derivative referred as until Boc insulin develops. In one preferred procedure t-Butyloxycarbonyl-Hydroxisuccinimidester (Boc Osu becomes particularly; Chem.Ber. (1975) 108, 2758-2763) used. Then a Thiolfunktion becomes introduced in form of a compound, which contains these in a protected form, if necessary. A bottom protected form of the thiol group one understands a compound, in which the Thiolfunktion is over a disulfide bond with another thiolhaltigen component, as for example Pyridinthion, linked. The thiolhaltige component can become then bottom reducing conditions cleaved.

In a preferred procedure way become the until Boc Insulinderivat with a thiol or a thiol a reactive component, for example a Thioalkylimidat, contained in protected form, a Thiolacton or a Pyridyldithioester reacted. By reaction of the N-terminal amino group of the intact or truncated insulin B chain with a thiolhaltigen active ester, whereby for example ester of the



Hydroxisuccinimids or o or p-nitrophenol used becomes to become to be able, the Thiolfunktion introduced.

In a particularly preferred procedure way N-Succinimidyl-3 (- 2-Pyridyldithio) becomes as thiolhaltige reactive component - used propionat.

Subsequent ones become after in the Peptidchemie conventional methods the t-Butyloxycarbonyl (Boc) - protecting groups cleaved, for example by treatment with trifluoroacetic acid or a HCl/an acetic acid mixture, but a preferred trifluoroacetic acid.

The thiolhaltige insulin derivative prepared on those above described manner becomes the preparation of a Insu of linderivates of the general formula I now with a thiolhaltigen or the Thiolfunktion in protected form contained physiological compatible carbon compound contacted. Over disulphide exchange between insulin and carbon compound, which both contain the Thiolfunktion or these in a protected form, a insulin S S CARBON COMPOUNDcomplex becomes prepared.

In a preferred procedure a thiolhaltiges protein, for the example an Proteinase inhibitor or a thiolhaltiger carrier, becomes used as physiological compatible carbon compound. In one preferred procedure alpha1-Antitrypsin used becomes particularly. It is however also possible to use carriers first no Thiolfunktion or these in a protected form contained. Such carrier substances are propionat before the conversion with thiolfunktionalisiertem insulin with thiolhaltigen reactive components, for example Thiolactonen or N-Succinimidyl-3-2 (Pyridyldithio) (SPDP) reacted; particularly preferred becomes the conversion with SPDP.

The preparation of an insulin derivative of the general formula II becomes the thiolhaltige insulin derivative with a thiolhaltigen, prepared on those above described manner, or the Thiolfunktion in protected form contained physiological compatible carbon compound reacted. Over disulphide exchange a insulin S s carbon compound becomes prepared.

In a preferred procedure become used as thiolhaltige carbon compound for example Pyridinthion, cysteine, mercaptopropionic acid, Mercaptoessigsäure, Pyridinthioncarbonsäure, glutathione, Cysteamin, Mercaptobernsteinsäure or Thiamin. In a particularly preferred procedure Pyridinthion becomes used.

On those above described manner of prepared alpha1-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex or Pyridyl S S INSULIncomplex is characterised particularly by the fact that the biological activity of the insulin obtained remains that it also at physiological pH value water-soluble and both i.m. and subcutaneous is more resorbable that it is protected in case of the alpha1-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplexes against proteolytic inactivation that a defined stoichiometry between insulin and physiological compatible substance is present, and that the pharmacokinetic properties than those of the old insulin or the prolonged-acting Depotinsuline are more favourable.

The pharmokokinetischen data of a alpha1-Antitrypsin-Insulin-Komplexes for intravenous and subcutaneous application are in table 1 shown.

The complexes between insulin and alpha1-Antitrypsin or Pyridinthion prepared on those above described manner can become the treatment of metabolic illnesses, for example the diabetes mellitus, used.

▲ top

These insulin connections can become in the form of agents, which blutisotinis and bactericidal made are and if necessary suitable physiological compatible additions and stabilisers contain, administered.

The insulin derivatives can do parenteral, e.g. i.v., i.m., s.c. or by means of an insulin pump applied become.

The subsequent example describe the invention.

#### Example 1

##### Albumin S S INSULIncomplex

##### a) Until Boc insulin

1 g pig insulin became in 37,5 ml DMF, 9.5 ml H<sub>2</sub>O and 2.7 ml 1 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung dissolved. Subsequent ones became 930 mg t-Butyloxycarbonyl-Hydroxisuccinimidester, which was in 2 ml DMF dissolved, added. The mixture was abrotiert 4 hours with room temperature agitated, with 50% acetic acid on pH 6.9 adjusted and the solvent. The oily residue became with 10 ml methanol staggered and subsequent in approx. 250 ml diethyl ethers cast in. The precipitation became over a glass frit separated, dried with ethyl acetate and diethyl ether multiple washed and over KOH P4010. Subsequent one became the dried precipitation in 6 ml 0.5% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> dissolved and over Sephadex TM G-50sf in 0,5% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gel-filtered. The until Boc insulin contained fractions combined and subsequent lyophilized became. Auswaage: 0.85 G.

##### b) PDP Bi Boc insulin

To 36 mg Bi-Boc-Insulinderivat in 3 ml 0.1 mol/l sodium phosphate, 100 mmol/l NaCl pH 7.5 one added bottom agitations dropwise 300  $\mu$ l N-Succinimidyl-3-2 (Pyridyldithio) propionat (SPDP) - solution (20 mmol/l in ethanol) too. The Lcsung left one 30 min. with room temperature stand. One separated the 2-Pyridyl-S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-Gly1-Insulin-bi-BOC (PDP Bi Boc insulin) by gel filtration at Sephadex G-50 in 5 g/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8.5 from impurities and lyophilized subsequent.

#### c) PDP insulin

30mg PDP Bi Boc insulin dissolved one in 400  $\mu$ l trifluoroacetic acid, which contained 40  $\mu$ l anisole. The solution one left bottom humidity exclusion to 30 min. with blank and 15 min with 4 DEG C stand. Subsequent ones one poured the solution in approximately 100 ml cold ether. The precipitation became multiple with ether washed, in 3 ml 5 g/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8.5 dissolved and by gel filtration at Sephadex TM G-50 von Verunreinigungen freed. The pure PDP insulin became subsequent lyophilized. In the UV spectrum dithiothreitol (DTE) was to be recognized an additional band with lambda max 343 Nm after reduction with 0,5 mmol/l, which correspond to free Pyridinthion.

#### d) Albumin S s insulin

33 mg Mercaptalbumin became in 4 ml 50 mmol/l potassium phosphate, 200 mmol/l NaCl pH 8.5 dissolved and with 3,3 mg PDP insulin in 1 ml the same buffer mixed. The reaction solution left one 1 h with blank and 4 h untouched with 4 DEG C. The formed albumin S S INSULIncomplex became separated by gel filtration at bio gel TM P 100 of the reaction partners. In the SDS gel was a band, which corresponded to a product of approximately 72,000 Dalton to recognize which split up after reduction with DTE into 2 bands with approximately 66,000 Dalton and 6,000 Dalton.

#### Example 2

PDP insulin became 1 described prepared as in example.

27 mg alpha1-Antitrypsin became dissolved in 2 ml a solution, which contained 50 mmol/l potassium phosphate and 200 mmol/l NaCl (pH 8.5) and 25 mmol/l dithiothreitol. The reduction solution left one 1 h untouched with 37 DEG C and 1 h with 4 DEG C and separated the subsequent reducing agent by gel filtration at Sephadex TM G-50 in same buffers. 27 mg alpha1-Antitrypsin-SH in 6 ml above buffer mixed one with 3,2 mg PDP insulin in 1 ml buffer. The treatment and workup of the complex mixture as in example 1 described made became. In the SDS gel a band with a mg from approximately 60,000 Dalton was to be recognized to. It disintegrated after reduction with DTE into 2 bands with molecular weights of eta 54,000 and 6,000 Dalton. The cleaned alpha1-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex shown inhibitive properties opposite proteases such as chymotrypsin, trypsin and elastase.

#### Example 3

It became a alpha1-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex as in example 2 prepared, whereby pig insulin became replaced by human insulin.

#### ▲ top Table 1

Blood sugar value in the rabbit after application of old insulin or alpha1-Antitrypsin-Insulin-Komplex in % dependence of the time in percent of the initial value EMI11.1

Each blood sugar value represents the mean value from the determination in 4 rabbits. It became believed that a substance, which contains 1 mg insulin, which possesses to blood-sugar-lower effect of 25 IE insulin.

#### Example 4

It became a alpha1-Antitrypsin-S-S-Insulin-Komplex as in example 2 prepared, whereby became used in place of pig insulin cattle insulin.

#### Example 5

Pancreatic trypsin inhibitor (PTI) - S-S-INSULIN-complex

First PTI became after J.Biol.Chem. 235 (2), 396-404 (1960) with N-acetyl-DI-Homocysteine-Thiolacton reacted. One received a Thiol functionalised inhibitor. The conversion with PDP insulin to the complex became 1 described performed as in example. The PTI S S INSULIncomplex shown inhibitive properties opposite plasmin and trypsin. In the SDS gel a band with a mg from 12.000 Dalton was to be recognized to.

#### Example 6

## Dextran S S INSULIncomplex

Aminofunktionalisiertes dextran became reacted as in example 3 described with N-acetyl-DL-Homocysteinthiolacton. The Thiolgehalt per mol dextran amounted to about 4 mol of thiol groups. The other conversion with PDP insulin to the complex became 1 described performed as in example.

## Example 7

## Cystein S S INSULIncomplex

PDP insulin (25, mg), as in example 1 described, prepared and dissolved in 5 ml 50 mmol/l sodium phosphate and 150 mmol/l NaCl, pH 5.0 became with 0,75 g Cysteinhydrochlorid in 100 ml of the same buffer reacted. The reaction became followed by measurement of the set free Pyridinthions with 343 Nm. The reaction product became lyophilized by gel filtration at Sephadex TM G-50sf in 5 g/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8.3 of Verunreinigungen separated and.

## Example 8

## Thiamin S S INSULIncomplex

25 mg PDP insulin in 2 ml 50 mmol/l sodium phosphate, pH 8.0 became with 0,7 mg dithiothreitol treated. Subsequent one became with 3 mg Thiamintetrahydrofurfuryldisulfid in 2 ml above buffer reacted. The reaction product became lyophilized by gel filtration at Sephadex TM G-50sf in 5 g/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8.3 of impurities separated and.

The insulin connections after example 5 to 8 shown in the rabbit model one to blood-sugar-lower effect.

▲ top